

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-69309

(P2004-69309A)

(43) 公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 27/30
 C 1 2 M 1/34
 G 0 1 N 27/416
 G 0 1 N 33/483
 // G 0 1 N 33/15

F I

G 0 1 N 27/30 F 2 G 0 4 5
 C 1 2 M 1/34 B 4 B 0 2 9
 G 0 1 N 33/483 F
 G 0 1 N 27/46 3 4 1 Z
 G 0 1 N 33/15 Z

テーマコード(参考)

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 16 頁) 最終頁に統く

(21) 出願番号

特願2002-224563(P2002-224563)

(22) 出願日

平成14年8月1日(2002.8.1)

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大学門真1006番地

(74) 代理人 100097445

弁理士 岩橋 文雄

(74) 代理人 100103355

弁理士 坂口 智廉

(74) 代理人 100109667

弁理士 内藤 浩樹

(72) 発明者 中谷 将也

大阪府門真市大学門真1006番地 松下電器産業株式会社内

(72) 発明者 岡 弘章

大阪府門真市大学門真1006番地 松下電器産業株式会社内

最終頁に統く

(54) 【発明の名称】細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法

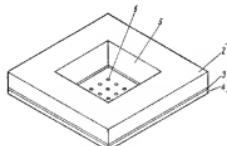
(57) 【要約】

【課題】細胞外電位測定デバイスにおいて複数のウエルを基板内に高密度に配置する必要があるときに、被験細胞を保持する窪みのウエル側の開口部の大きさと貫通口側の大きさを二段階にする必要があり、この形状を正確に実現する方法が期待されていた。

【解決手段】基板1がベース2と、このベース2とは異なる材料による中間層3と、ベースとほぼ同じ材料による薄板4の積層構造からなり、前記ベース2内に少なくとも一つ以上のウエル5と、前記薄板4内に前記ウエル5と基板1の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口6を設ける。

【選択図】 図1

- 1 基板
- 2 ベース
- 3 中間層
- 4 薄板
- 5 ウエル
- 6 貫通口



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイス。

【請求項 2】

貫通口のウエル側に窪みを有するとともに、この窪みの開口部を貫通口の開口部より大きくした請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

10

【請求項 3】

窪みの内壁を円錐形とした請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 4】

窪みの内壁を半球形とした請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 5】

中間層の電気抵抗率を薄板の電気抵抗率よりも高くした請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 6】

中間層と薄板を構成する材料と同じエッティングガスに対するエッティングレートの比が異なる材料で構成した請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

20

【請求項 7】

ベース及び薄板がシリコンからなり、中間層が二酸化シリコンからなる請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 8】

窪みの開口部が $1.0 \sim 1.00 \mu\text{m}$ であり、貫通口の開口部が $1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ である請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 9】

基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、ベースにエッティングによって前記ウエルを設ける工程と、薄板に 1 種類のマスクを用いたドライエッティングによって前記貫通口を設ける工程と、ウエルの底部の中間層をドライエッティングによって除去する工程と、外方側より薄膜技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法。

30

【請求項 10】

薄板に 1 種類のマスクを用いたドライエッティングによって貫通口を設ける工程において、外方側よりドライエッティングによって形成されるとともに、このドライエッティングは少なくともエッティングを抑制するガスとエッティングを促進するガスの 2 種類を用いて行う請求項 9 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

40

【請求項 11】

貫通口を形成する際のドライエッティングにおいて、エッティングを抑制するガスを用いる工程とエッティングを促進するガスを用いる工程とを交互に繰り返して行う請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 12】

貫通口を設ける工程において、エッティングを促進するガスとエッティングを抑制するガスによるドライエッティングの比率がエッティングが進むに従って高くなるようにエッティングする請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 13】

貫通口を設ける工程において、エッティングを促進する工程とエッティングを抑制する工程を

50

繰り返して行うドライエッティングは二酸化珪素からなる中間層に達する前に止め、次にエッティングを促進するガスのみで二酸化珪素による中間層に達するまでドライエッティングを行う請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項14】

エッティングを促進するガスを用いる工程とエッティングを抑制するガスを用いる工程において、前記ガスを分解するための手段としてコイルによる誘導結合法を用い、ドライエッティングを促進する工程の際には基板に高周波をかけて行い、ドライエッティングを抑制する工程の際には基板に高周波をかけないで行う請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項15】

貫通口を形成する工程において、ドライエッティングを促進する工程とドライエッティングを抑制する工程を繰り返して行い、二酸化珪素を主体とする中間層にドライエッティングが達した後も過剰に薄板をドライエッティングする請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項16】

ベースと薄板がシリコンよりなり、中間層が二酸化珪素よりなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、下部層に貫通口を形成する際に使用するガスとして、エッティングを促進するガスが $S F_6$, $C F_4$, $X e F_2$ のうちいずれか一つを含むガスであり、エッティングを抑制するガスが $C_4 F_8$, $C H F_3$ のいずれかまたはこれらを含むガスを用いる請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞外電位あるいは細胞の活動に発生する物理化学的変化を測定するために用いられる細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法であり、例えば化学物質によって細胞が発する反応を検出する薬品スクリーニングに用いられる。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の電気的活動を指標にして薬品をスクリーニングすることはパッチクランプ法、蛍光色素または発光指示薬を用いる方法により行われている。

【0003】

このパッチクランプ法はマイクロビペットの先端部分に付けた細胞膜の微小部分（パッチと呼ぶ）を用いて、單一のチャネルタンパク質分子を介するイオンの輸送を微小電極プローブによって電気的に記録する方法であり、この方法は一個のタンパク質分子の機能をリアルタイムで調べることのできる数少ない方法の一つである（たとえば、細胞の分子生物学、第三版、Garland Publishing Inc.、New York、1994、日本語版、中村桂子ら監訳、181～182頁、1995年、教育社参照）。

【0004】

また、特定のイオンの濃度変化に応じて光を発する蛍光色素または発光指示薬により、細胞内のイオンの移動をモニタすることで細胞の電気的活動を測定する方法もある。

【0005】

しかし、パッチクランプ法ではマイクロビペットの作成及び操作に特殊な技術を必要とし、一つの試料の測定に多くの時間を要するため大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする用途には適していない。また、蛍光色素などを用いる方法は大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングできるが、細胞を染色する工程が必要で測定においては色素の影響によるバックグラウンドが高い上に時間とともに脱色するためS/N比が悪いという欠点がある。

【0006】

これに代わる方法として、既に特願2001-001980号および特願2001-170341号により開示される方法は、パッチクランプ法で得られるデータと同等の高品質

10

20

30

40

50

なデータが得られ、しかも蛍光色素を用いる方法のように簡易に高速で大量の試料を測定できるものである。これらの先行技術では、基板上に設けられた細胞の保持手段を有する少なくとも一つのウエルと、このウエルに電気信号を検出するセンサー手段とを有する細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する、いわゆる細胞外電位測定デバイスについて開示している。今少し、上記先行技術で開示される細胞外電位測定デバイスの動作について図面を用いて説明する。

【0007】

図20は上記先行技術で開示される細胞外電位測定デバイスのウエル構造を模式断面図で示したものであり、ウエル40内に培養液48が入れられ、被験体細胞47は基板42に設けられた細胞保持手段によって捕捉または保持されている。細胞保持手段は基板42に形成された窪み41および開口部を介して、この窪み41に連絡する貫通口44を備えている。さらに、貫通口44の中にはセンサー手段である測定電極45が配置されており、この測定電極45は配線を経て信号検出部に連結されている。

【0008】

測定の際には、被験体細胞47を貫通口44側から吸引ポンプなどの手段によりこの被験体細胞47が窪み41部分に密着保持される。このようにして被験体細胞47の活動により発生する電気信号はウエル40中の培養液48側に漏れることなく、貫通口44側に設けた測定電極45によって検出される。

【0009】

ここで、窪み41部に被験体細胞47を保持させるためには窪み41の上部に被験体細胞47、培養液48およびこれと反応する薬剤を混合させるための容器であるウエル40が必要である。従来の例では、ウエル40は基板42とは別に設けられ、図20のように窪み41の上部にセットされていた。

【0010】

さらに、被験体細胞47を保持する窪み41部の大きさは10～30μm程度であり、貫通口44側の大きさが1～5μmと2段階になっている上、貫通口44の長さは、通常10μm程度にする必要がある。この形状を正確に実現するためには、2種類のマスクを用いて、まず、第一のマスクによって窪み41のドライエッティングを行った後、第二のマスクによって貫通口44のドライエッティングを行う必要がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記のような細胞外電位測定デバイスにおいて特に問題となるのはウエル40と貫通口44と窪み41の形成された基板42とを別々に設けると、ウエル40と基板42の貼り合わせが必要であるとともに正確な位置合わせも必要である。特に複数のウエル40を基板42内に高密度に配置する必要がある場合には、位置合わせに加えて液体が漏れ出さないように確実に貼り合わせる必要があり、その作業は困難なものとなる。

【0012】

さらに、上述のように2種類のマスクを用いて行うと第一のマスクによるドライエッティングを行った後、第二のマスクを用いてドライエッティングを行う際にマスクのアライメントずれが生じるという課題が発生する。

【0013】

又、2枚のマスクを用意して、それぞれ別々にフォトリソグラフィを行うので製造的にも手間がかかり、コスト高を招くことがある。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項1に記載の発明は、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記窪板内に前記ウエルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスであ

10

20

30

40

50

り、ベース内にウエルが設けられているので、別途ウエルを設ける必要がなく、基板の中にウエル、貫通口が一体化されている極めてコンパクトな細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0015】

本発明の請求項2に記載の発明は、貫通口のウエル側に窪みを有するとともに、この窪みの開口部を貫通口の開口部より大きくした請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、被験体細胞は貫通口側に引き込まれるとともに、窪み内に確実に保持することができる。

【0016】

本発明の請求項3に記載の発明は、窪みの内壁を円錐形とした請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、円錐形とすることにより、ウエル側から被験体細胞が容易に進入することができる、かつ円錐形内には一つの被験体細胞しか進入できないので、被験体細胞の保持がより確実にできる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0017】

本発明の請求項4に記載の発明は、窪みの内壁を半球形とした請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、一つの被験体細胞が進入可能なことに加えて、貫通口との接続面が半球形であるので、この貫通口との接続面に被験体細胞の表面がより確実に接することとなり、被験体細胞の保持を確実にできる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0018】

本発明の請求項5に記載の発明は、中間層の電気抵抗率を薄板の電気抵抗率よりも高くした請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、貫通口および窪みを薄板側からドライエッ칭によって形成する際に、エッティングダイオングが電気抵抗率の大きい中間層に蓄積することにより、エッティングダイオングが中間層の近辺の薄板部分をもドライエッ칭するようになるので貫通口のドライエッ칭時に同時に窪みを形成できるという製造上の利点を有する細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0019】

本発明の請求項6に記載の発明は、中間層と薄板を構成する材料を同じエッティングガスに対するエッティングレートの比が異なる材料で構成した請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、薄板に貫通口と窪みをドライエッ칭によって形成する際に、エッティングが中間層に達した後も中間層をドライエッ칭してしまわないようにできるので、より高精度な貫通口および窪みの形成を実現できるという製造上の利点を有する細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0020】

本発明の請求項7に記載の発明は、ベース及び薄板がシリコンからなり、中間層が二酸化シリコンからなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、シリコンと二酸化シリコンは同じドライエッ칭ガス、例えばS F₆、C F₄、X e F₂に対して大きなエッティングレートの差を持つことから、薄板に貫通口および窪みを高精度に形成できるという請求項6に記載の発明の効果を補完するものである。

【0021】

本発明の請求項8に記載の発明は、窪みの開口部が10～100μmであり、貫通口の開口部が1～10μmである請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、例えは被験体細胞の大きさが10μmである場合に、窪みの開口部の大きさを15μm、貫通口の大きさを5μmとすれば、被験体細胞は窪み内に一つしか進入できず、かつ貫通口を通り抜けることはできないので、確実に窪みに保持される細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0022】

本発明の請求項9に記載の発明は、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースとほぼ同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエ

10

20

30

40

50

ルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、ベースにエッチングによって前記ウエルを設ける工程と、薄板に1種類のマスクを用いたドライエッチングによって前記貫通口を設ける工程と、ウエルの底部の中間層をドライエッチングによって除去する工程と、外方側より薄膜技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、薄板に貫通口を形成する際に貫通口のウエル側に貫通口の大きさより広い窪みを1種類のマスクを用いるだけで容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0023】

本発明の請求項10に記載の発明は、薄板に1種類のマスクを用いたドライエッチングによって貫通口を設ける工程において、外方側よりドライエッチングによって形成されるとともに、このドライエッチングは少なくともエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いて行う請求項9に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッティングを抑制するガスとエッティングを促進するガスを用いると、ドライエッチングの抑制と促進の割合を制御しながらドライエッティングができるので、貫通口の穴サイズが少なくとも外方側においてマスクと同じ大きさになるように垂直にドライエッティングすことができる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0024】

本発明の請求項11に記載の発明は、貫通口を形成する際のドライエッティングにおいて、エッティングを抑制するガスを用いる工程とエッティングを促進するガスを用いる工程とを交互に繰り返して行う請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の穴形状がより垂直にドライエッティングできるようになるという請求項10に記載の発明の効果を補完するものである。

【0025】

本発明の請求項12に記載の発明は、貫通口を設ける工程において、エッティングを促進するガスとエッティングを抑制するガスによるエッティングの比率がエッティングが進むに従って高くなるようにエッティングする請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の形成工程が進むにつれてドライエッティングを促進するガスの割合が増えると、貫通口のウエル側のエッティング径が広がり、ウエル側に窪みが容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0026】

本発明の請求項13に記載の発明は、貫通口を設ける工程において、ドライエッティングを促進する工程とドライエッティングを抑制する工程を繰り返して行うドライエッティングは二酸化珪素からなる中間層に達する前に止め、次にエッティングを促進するガスのみで二酸化珪素による中間層に達するまでドライエッティングを行う請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、中間層に達する前にドライエッティング条件を変えるので、貫通口と窪みを連続的に容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0027】

本発明の請求項14に記載の発明は、ドライエッティングを促進するガスを用いる工程とエッティングを抑制するガスを用いる工程において、前記ガスを分解するための手段としてコイルによる誘導結合法を用い、ドライエッティングを促進する工程の際には基板に高周波をかけて行い、ドライエッティングを抑制する工程の際には基板に高周波をかけないで行う請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、ドライエッティングを促進する時に基板に高周波を印加するとともにエッティングを抑制する時には印加しないので均一な保護膜の形成が可能となる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0028】

本発明の請求項15に記載の発明は、貫通口を形成する工程において、ドライエッティングを促進する工程とドライエッティングを抑制する工程を繰り返して行い、二酸化珪素を主体

10

20

30

40

50

とする中間層にドライエッティングが達した後も過剰に薄板をドライエッティングする請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、中間層に達した後も過剰にドライエッティングを行うことでエッティングダイオノンを中間層の表面に蓄積させることができ、このためドライエッティングは中間層付近ではエッティングが横方向に広がるようになる。そのために貫通口の形成と同時にウエル側に窪みを容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0029】

本発明の請求項16に記載の発明は、ベースと薄板がシリコンよりなり、中間層が二酸化珪素よりなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、下部層に貫通口を形成する際に使用するガスとして、エッティングを促進するガスがS F₆、C F₄、X e F₂のうちいずれか一つを含むガスであり、エッティングを抑制するガスがC₄ F₈、C H F₃のうちいずれか一つを含むガスを用いる請求項10に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の外方側はマスクと同じ大きさの垂直なドライエッティング形状であり、ウエル側はこれよりも広い窪みとすることができる請求項10～15に記載の発明の効果を補完するものである。

【0030】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法について実施の形態および図面を用いて説明する。

【0031】

（実施の形態1）

本発明の実施の形態1及び図1～図13により請求項1～3、6～12、14及び16に記載の発明について説明する。

【0032】

図1は本発明の実施の形態1における細胞外電位測定デバイスの一実施の形態を示す斜視図であり、図2及び図3はその断面図である。また図4～図5は同要部の拡大断面図である。更に図6～図13は細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図である。

【0033】

図1～図3において、基板1はシリコンからなるベース2、二酸化珪素からなる中間層3及びシリコンからなる薄板4の積層構造で構成されている。このベース2には被験体細胞を含むサンプル溶液を貯め、被験体細胞10とこれの培養液11と薬剤を混ぜ合わせるためにウエル5が設けられており、さらにウエル5の底部の薄板4には貫通口6が設けられている。この貫通口6のウエル5側に窪み7が設けられており、ウエル5側の開口部の大きさが基板1の下面の開口部より大きい形状に加工してある。

【0034】

なお、貫通口6、窪み7の大きさは被験体細胞10の大きさ・性質によって決めることができる。例えば被験体細胞10の大きさが10 μmであれば、窪み7の大きさは10 μm以上、20 μm以下とし、貫通口6の大きさは5 μm以下とすることが好ましい。

【0035】

また、本実施の形態1においては窪み7の内壁部はウエル5側を底面とする円錐形をしている。

【0036】

次に、少なくともウエル5の内壁および底面、貫通口6の内壁および窪み7の内壁、薄板4の下面にはシリコンの上に二酸化シリコンによる絶縁体9が設けられており、さらに貫通口6の内壁、薄板4の外方側には上記絶縁体9の上に金を主体とする検出電極8が設けられている。

【0037】

又、一般的に細胞の大きさは5～20 μmであるので窪み7の開口部は10～100 μmとし、貫通口6の開口部は1～10 μmの範囲とすることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0038】

上記のような構成を有する細胞外電位測定デバイスは次のような動作によって細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定することができる。この動作について図面を用いて説明する。

【0039】

図3は細胞外電位測定デバイスに被験体細胞10と培養液11をウェル5内に投入したときの様子を断面図で示しており、図4～図5は貫通口6および窪み7の部分の要部拡大断面図である。

【0040】

図3に示すように、ウェル5内に培養液11と被験体細胞10を入れると、しばらく被験体細胞10は培養液11中に浮遊している。また培養液11は液体であるのでウェル5内だけでなく窪み7、貫通口6を満たした後、ウェル5の下面側にも流れ出す。このようにすると、浮遊している被験体細胞10はウェル5内の圧力によつて、図4に示すように窪み7へ引き込まれる。引き込みの圧力が足りない場合には貫通口6側から吸引ポンプなどの手段により吸引すると浮遊している被験体細胞10はより確実に窪み7側に吸引することができる。

【0041】

次に、窪み7へ到達した被験体細胞10は貫通口6側からの吸引あるいはウェル5側からの培養液11によって圧力を受けていることから、図4のように窪み7に保持される。このような状態でウェル5内の培養液11に薬剤(図示せず)を投与すれば、薬剤は培養液11内に浸透し、図5に示すように被験体細胞10が薬剤とイオンの交換による反応が発生して活性化された場合に、貫通口6内で発生した電気信号は貫通口6に満たされている培養液11の電位を変化させることになる。この電位の変化は培養液11に接している検出電極8によって外部に取り出される。

【0042】

このように、本発明の細胞外電位測定デバイスではウェル5の底面に窪み7が設けてあるので、従来のように別途ウェルを設ける必要がなく、ウェル5内に被験体細胞10と培養液11および薬剤を直接混合させることができる。また、ウェル5と底面に設けられた窪み7および貫通口6は一体化されているので、培養液11が不用意にウェル5外に漏れ出すこともなく確実に貫通口6側へ流れることができる。

【0043】

さらに、窪み7の内壁、貫通口6の内壁、薄板4の下面、ウェル5の底面および内壁には二酸化シリコンからなる絶縁体9が設けられているので、検出電極8はウェル5側とは電気的に絶縁されている。さらに、窪み7の内壁はウェル5側を底面とする円錐形をしているので、被験体細胞10が貫通口6側に滞ることなく引き込まれて安定に保持することができる。一例として被験体細胞10の大きさが $10\text{ }\mu\text{m}$ である場合において、窪み7のウェル側の大きさ、つまり円錐形の底面の大きさは $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることにより、2つ以上の被験体細胞10が同時に窪み7の中に進入することができなくなり、貫通口6の大きさは $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることにより、被験体細胞10が貫通口6を通り抜けることはない。

【0044】

このように、測定の際には被験体細胞10は窪み7に確実に保持されている状態を実現することができる。つまり、貫通口6側の培養液11と、ウェル5側の培養液11とは電気的に絶縁された状態にあるので、被験体細胞10の活動により発生する電気信号はウェル5側の培養液11に漏れることなく、貫通口6側に設けた検出電極8によって検出することができる。なお、上記絶縁層9はシリコンの表層の表面抵抗率が低いときに貫通口6付近で発生する信号が微小であり、わずかでもウェル5側にリークすると測定できなくなってしまう場合においてのみ必要となってくる。

【0045】

従って、シリコン自体の表面抵抗率が十分高ければ被験体細胞10が保持されるだけで十分電気的な絶縁性が実現されるので、わずかなリークが問題ない程度に細胞外電位が大き

10

20

30

40

50

いのであれば絶縁体9は必ずしも必要ではない。

【0046】

次に本発明の細胞外電位測定デバイスの製造方法について図6～図13を用いて説明する。

【0047】

上記細胞外電位測定デバイスの製造方法は図6に示すようにシリコンからなるベース2と、二酸化シリコンからなる中間層3と、シリコンからなる薄板4で構成される基板1を用意し、薄板4側にレジストマスク12を形成する。なお、上記のような基板1は一般にSOI基板と呼ばれ、半導体デバイスを作製する際に良く用いられ、入手は容易であるのでこの基板の製造方法については省略する。

10

【0048】

次に、ドライエッ칭によって貫通口6を薄板4の所定のエッチング深さに達するまで形成する。図7は図6のA部の要部拡大図を示している。このときのエッチング法はドライエッ칭による方法が最適であり、ドライエッ칭の際にはエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを用いることが重要である。

【0049】

このエッチングを促進するガスにはSF₆、CF₄、XeF₂などを用いることができるが、これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけでなく、横方向へのエッチングも促進する作用がある。

【0050】

そこでCHF₃、C₄F₈、XeF₂などのエッチングを抑制するガスを混合させておくことで、ドライエッチングされた壁面にC F₂のポリマーである保護膜を作製することにより、図7に示すようにドライエッチングによる貫通口6の形成をレジストマスク12の下方のみに進行させることができるとなる。

20

【0051】

また、エッチング形状を垂直にする別の方法として、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッチング形状とすることができる。

【0052】

実験では、大きさ5μmの貫通口6を形成するためにSF₆を130sccm流しながら1.3秒間プラズマ発生させることで約1μmのドライエッチングを行い、その後C₄F₈を8.5scm流しながら7秒間プラズマ発生させた後約0.01μmの保護膜を形成し、またドライエッチングを行なうという作業を6回繰り返して約7μmの深さのほぼ垂直なエッチング形状とすることができた。なお、エッチングを抑制するガスによって保護膜は貫通口6の壁面だけでなく底面にも形成されるが、底面に形成された保護膜は壁面に形成された保護膜に比べてエッチングを促進するガスによって容易に除去することができるので、エッチングは下方のみに進むことが可能となる。

30

【0053】

さらにエッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、外部コイルによる誘導結合法による高周波を基板1に加えることで基板1にマイナスのバイアス電圧が発生することにより、プラズマ中のプラスイオンであるSF₅⁺やCF₃⁺が基板1に向かって衝突するのでドライエッチングはより垂直な方向に進むことになる。

40

【0054】

また、ドライエッチングを抑制させる際には基板1に高周波を加えなければ基板1にはバイアス電圧が全く発生しないので、保護膜の材料となるCF⁺が偏向を受けなくなり、基板1のドライエッチング穴の壁面へ均一な保護膜の形成ができることになる。

【0055】

さらに図8に示すように、ドライエッチングによって中間層3に達するまでドライエッチングを行うが、本工程において重要なことは薄板4側からドライエッチングを行って掘り進めていく際に、エッチングが進むにつれてエッチングを促進するガスの割合を徐々に増

50

やしていく、あるいはエッティングを促進するガスによるエッティング時間を徐々に増やすことである。つまり、ドライエッティングが促進される工程とドライエッティングが抑制される工程が繰り返される過程において、ドライエッティングが促進される工程の割合をドライエッティングが進むにつれて徐々に増やすのである。

【0056】

これによりエッティングの形状は図8に示すようにウエル5側が広くなるようにテーパ形状が設けられるようになり、貫通口6は薄板4の下面側の開口部よりウエル5側の開口部の方が大きくなるように形成することができる。

【0057】

このドライエッティングの工程において、中間層3として二酸化シリコンが設けてあるので、貫通口6のドライエッティングが完了して中間層3に達したときに、ドライエッティングをすぐに止めなくとも支障は発生しない。それはエッティングガスがすぐには中間層3をエッティングすることはないとからである。

【0058】

特に、エッティングを促進するガスにSF₆を用いた場合には、このエッティングガスはシリコンと二酸化シリコンのエッティングレートの比が1.0以上であるので、貫通口6のドライエッティングが二酸化シリコンまで到達した後しばらくエッティングしても、二酸化シリコンの中間層3を簡単には除去しないので高寸法精度の窪み7を容易に形成することができる。

【0059】

次に、図9に示すようにベース2側にフォトリソグラフィーによってレジストマスク1.3を形成した後、図10に示すようにエッティングによって中間層3に達するまでベース2をエッティングし、ウエル5を形成する。このときのエッティング方法としては前述のようなエッティングを促進するガスとエッティングを抑制するガスを用いたドライエッティングがウエル5を高密度に配置するためには有利であるが、それほど高密度に配置する必要がないのであればTM_AHやKOHを用いたウェットエッティングでも可能である。

【0060】

次に図11に示すように、ウエル5の底面に露出した二酸化シリコンの中間層3をエッティングによって除去する。このときの方法はHFによるウェットエッティングの他、CF₄ガスによるドライエッティングなどが利用できる。

【0061】

その後、図12に示すように、レジストマスク1.3を除去した後に、熱酸化法によってベース2及び薄板4を構成しているシリコンの表面に二酸化シリコンを形成する。これによって、少なくともウエル5の内壁および底面、窪み7の内壁、貫通口6の内壁、薄板4の下面に二酸化シリコンによる絶縁層9が形成される。

【0062】

次に、図13に示すように、薄板4の下面側から金を蒸着やスパッタにより検出電極8を形成する。これにより、検出電極8は薄板4の下面だけではなく、貫通口6の内壁にも形成される。なお、この検出電極8の材料は培養液1.1と反応しない電極材料であれば使用することができるが、特に金、白金、銀、塩化銀、アルミニウムなどを用いることがより好ましい。どの電極材料を設けるかはサンプル溶液の種類によって適当な材料が選ばるべきである。

【0063】

このように、本発明の製造方法を用いることにより、薄板4に形成する貫通口6が円錐形の窪み7をウエル5側に連結された状態で1枚のフォトマスクと薄板4側からの一度のエッティングだけで細胞外電位測定デバイスを容易に且つ高精度に形成することができる。

【0064】

(実施の形態2)

本発明の実施の形態2及び図14～図16により請求項4、1.3に記載の発明を説明する。図14は本発明の実施の形態2における細胞外電位測定デバイスの構成とその製造方法

10

20

30

40

50

を説明するための断面図であり、図15及び図16はその要部拡大断面図である。

【0065】

次に、実施の形態2における細胞外電位測定デバイスの構成とその製造方法について説明する。実施の形態2で開示される発明は実施の形態1で開示される細胞外電位測定デバイスと基本的な構成は同じであり、同じ構成についての説明は省略し、異なる構成についてのみ説明する。

【0066】

図14は本実施の形態2における細胞外電位測定デバイスの断面図であり、薄板18に形成された窪み21の形状が図14に示すように半球形をしている点で異なっている。窪み21をこのような半球形の形状とすることにより、被験体細胞10はより密着して窪み21へ保持することができることから貫通口20の培養液11の電位変化をより捉えやすくすることが可能となるものである。

【0067】

次に、この細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明する。

【0068】

本実施の形態2における細胞外電位測定デバイスの製造方法は実施の形態1の製造方法とほぼ同じ工程を経て作製することができるが、異なる点は薄板18に貫通口20及び窪み21を形成する方法のみであり、この部分の製造方法について図面を用いて説明する。

【0069】

この工程は図15に示すように、中間層17と薄板18が積層された状態で薄板18側にレジストマスク24を形成した後貫通口20を形成するためにエッチャングを促進するガスとエッチャングを抑制するガスによるドライエッチャングを行い、所定の深さに達したときにエッチャングを終了する。この所定の深さとは二酸化珪素からなる中間層17に達する前に止めることであり、窪み21の寸法形状に応じて最適な深さを適宜選択することができる。

【0070】

そして、このとき重要なことはエッチャングの終了時にはエッチャングを抑制するガスの供給を止めてエッチャングを行った後に終了することである。

【0071】

又、エッチャングを促進するガスによってエッチャングを少しだけ行った後、エッチャングを抑制するガスによって保護膜(図示せず)を少しだけ形成する工程を繰り返すドライエッチャングを行うときのエッチャングの終了はエッチャングを促進するガスによるドライエッチャングの工程で終了することが重要である。これは、エッチャングを抑制するガスによって形成される保護膜をエッチャングの底面から除去するためである。

【0072】

次に、図16に示すように窪み21を形成するためのエッチャングではXeF₂ガスを導入してドライエッチャングを行うものである。

【0073】

この作業により、ドライエッチャングはシリコンが露出している底面から進み、ウェル19側に進むに従って広がるようにエッチャングが進む。

【0074】

この時、貫通口20の側壁には前の工程でエッチャングを抑制するガスによって形成された保護膜(図示せず)が形成されているためにXeF₂によってドライエッチャングされることはない。このようにして、窪み21は図16のように半球形をした形状に形成することができる。

【0075】

その後、実施の形態1と同じように図9～図13の工程を経て細胞外電位測定デバイスを作製することができる。

【0076】

(実施の形態3)

10

20

30

40

50

本発明の実施の形態3及び図17～図19により請求項5、15に記載の発明を説明する。図17は本発明の実施の形態3における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図であり、図18及び図19はその要部拡大断面図である。

【0077】

本実施の形態3では実施の形態1、実施の形態2で開示される貫通口6、20と窪み7、21を形成する別の製造方法について開示する。

【0078】

実施の形態1及び2で説明してきた製造法と異なる点は薄板26に貫通口30を形成する方法のみであるので、この部分の形成方法について図面を用いて説明する。

【0079】

図17は二酸化珪素よりなる中間層25とシリコンよりなる薄板26が積層された状態で薄板26側にレジストマスク27を形成した後、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスによる貫通口30を形成するためにドライエッチングを行った状態を示している。この状態において、エッチングは中間層25に達するまで過剰に行うことが特徴である。

【0080】

そして、このドライエッチングが中間層25に達した後もさらにエッチングを続ける。このときの中間層25は絶縁体であり、シリコンなどからなる薄板26はこの中間層25より絶縁抵抗が低い。このような構成で上記のようなエッチングを過剰に続けると、中間層25の面にはエッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、図18に示すようにエッティングイオン28（たとえばSF₆⁺）が滞留するようになり、プラズマ中から供給されるエッティングイオン29は図18に示す矢印の方向にはじかれるようになる。

【0081】

その結果、このような構成においてドライエッチングを過剰に行うと中間層25の側壁近傍に集中的にドライエッチングが行われるようになり、図19に示すように貫通口30のウエル側が広がった窪み31を形成することができる。

【0082】

実験では直径3μmの貫通口30のドライエッチングを中間層25に達した後も過剰に行うことでき、10μmの窪み31を形成することができた。

【0083】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、ベース内にウエルと薄板内に貫通口が設けられ、この貫通口はウエル側の開口部の方が外方側より大きい窪みを有した細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定するデバイスおよびこの製造方法を実現することによって、別途ウエルを設ける必要がなく、基板の中にウエル、貫通口が一体化形成されている極めてコンパクトな細胞外電位測定デバイスとすることができる。

【0084】

又、上記デバイスを製造する場合、2種類のマスクをウエル側からフォトリソグラフィーを行う必要がなくなるとともにウエルを設けた基板のように凸凹がある場合においても凸凹面にも均一にレジストをコーティングするスプレーコーティング装置やフォトマスクと基板が非接触で高精度なパターンが露光できるプロジェクションやステッパーなど高価な装置を必要とせずに、極めて高精度な貫通口および窪みをウエル底面に設けられる製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施の形態1における細胞外電位測定デバイスの斜視図

【図2】(a) 同断面図 (b) 同要部拡大断面図

【図3】同細胞外電位測定デバイスの動作を示す断面図

【図4】同要部拡大断面図

【図5】同要部拡大断面図

10

20

30

40

50

【図 6】本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図

【図 7】同要部拡大断面図

【図 8】同要部拡大断面図

【図 9】同断面図

【図 10】同断面図

【図 11】同断面図

【図 12】同断面図

【図 13】同断面図

【図 14】本発明の実施の形態 2 における細胞外電位測定デバイスの断面図

10

【図 15】同細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための要部拡大断面図

【図 16】同要部拡大断面図

【図 17】本発明の実施の形態 3 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための要部拡大断面図

【図 18】同要部拡大断面図

【図 19】同要部拡大断面図

【図 20】従来の細胞外電位測定デバイスの模式断面図

【符号の説明】

1 基板

20

2 ベース

3 中間層

4 薄板

5 ウエル

6 貫通口

7 窒み

8 検出電極

9 絶縁体

10 被験体細胞

11 培養液

30

12 レジストマスク

13 レジストマスク

15 基板

16 ベース

17 中間層

18 薄板

19 ウエル

20 貫通口

21 窒み

22 検出電極

23 絶縁体

40

24 レジストマスク

25 中間層

26 薄板

27 レジストマスク

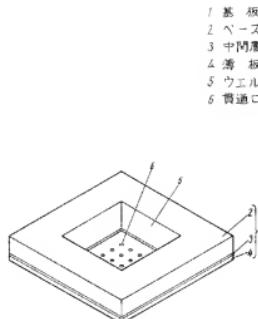
28 エッチングイオン

29 エッチングイオン

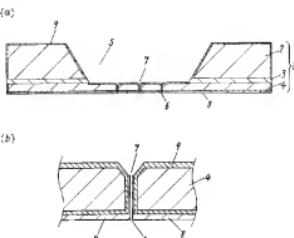
30 貫通口

31 窒み

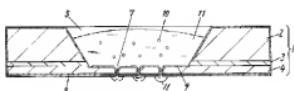
【図 1】



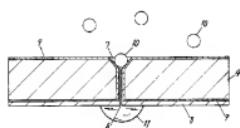
【図 2】



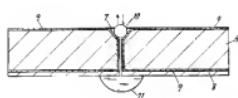
【図 3】



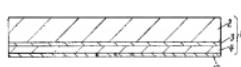
【図 4】



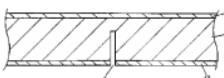
【図 5】



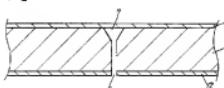
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 1 1】



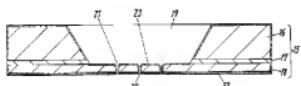
【図 1 2】



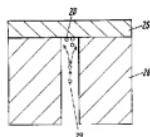
【図 1 3】



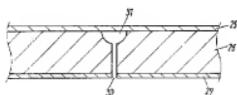
【図 1 4】



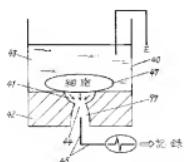
【図 1 8】



【図 1 9】



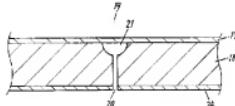
【図 2 0】



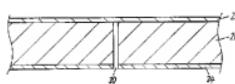
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード（参考）
G 0 1 N 33/50 G 0 1 N 33/50 Z

(72) 発明者 江本 文昭
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器産業株式会社内
F ターム(参考) 2G045 CB01 FB05 GC18 HA02
4B029 AA07 AA24 BB01 FA01